This Page Is Inserted by IFW Operations and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- (•) TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents will not correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM

Internationale ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/82, 15/53, A01N 63/00, A01H 5/00

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 97/22707

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

26. Juni 1997 (26.06.97)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE96/02428

(22) Internationales Anmeldedatum:

17. December 1996 (17.12.96)

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

195 47 272.1

19. December 1995 (19.12.95)

CERFF, Rudiger [DE/DE]; (71)(72) Anmelder und Erfinder: Karlsstrasse 28, D-38106 Braunschweig (DE). DURING, Klaus [DE/DE]; Eichenring 16, D-06507 Gernrode (DE). HEHL, Reinhard [DE/DE]; Schubertstrasse 1, D-38114 Braunschweig (DE). KÖHLER, Uwe [DE/DE]; Lindenweg 25, D-31559 Haste (DE).

Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Anderungen eintreffen.

(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; BioTez Berlin-Buch GmbH,

(54) Title: AN EXPRESSION SYSTEM FOR ANAEROBIC GENE EXPRESSION IN HIGHER PLANTS

(54) Bezeichnung: EIN EXPRESSIONSSYSTEM FÜR DIE ANAEROBE GENEXPRESSION IN HÖHEREN PFLANZEN

(57) Abstract

The invention relates to an expression system for anaerobic gene expression in higher plants. The expression system according to the invention comprises the promoter GapC4 or parts or variants thereof and a gene to be expressed.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Expressionssystem für die anaerobe Genexpression in höheren Pflanzen. Das erfindungsgemäße Expressionssystem umfaßt den Promoter GapC4 oder Teile oder Varianten des Promotors GapC4 und ein zu exprimierendes Gen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
ΛÜ	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
ВВ	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	ΙT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumānien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakci
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamenin	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ.	Tschechische Republik	ĹŸ	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
E3 Fl	Finnland	MN	Mongolei	υZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Ein Expressionssystem für die anaerobe Genexpression in höheren Pflanzen

1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Expressionssystem für die anaerobe Genexpression in höheren Pflanzen. Ein konkretes Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Landwirtschaft, insbesondere die Resistenzzüchtung und die Steigerung der Leistungsfähigkeit von Nutzpflanzen.

Der Verlust an Erntegut durch Erkrankungen von Pflanzen ist ein weltweites Problem. Zum Beispiel führt die Erkrankung der Kartoffel an Knollennaßfäule (Verfaulen der Knolle) und Schwarzbeinigkeit (Verfaulen der unteren Stengelabschnitte), nach Infektion durch das phytopathogene Bakterium Erwinia carotovora, weltweit zu Ernteverlusten in einer geschätzten Höhe von 100 Millionen Dollar (Pérombelon und Kelman, 1980, Ann. Rev. Phytopathol., 18, 361-387). Es gibt eine Reihe von Arbeiten, die sich mit der gentechnischen Übertragung von Resistenzfaktoren auf Pflanzen beschäftigen (Lamb et al., 1992, Bio/Technology, 10, 1436-1445; Hain und Fischer, 1994, Current Opinion in Biotechnology, 125-130; Zhu et al., 1994, Bio/Technology, 12, 807-812). Zur Resistenzsteigerung der gegenüber Erwinia carotovora wurde das **T4** Kartoffel Lysozymgen des Bakteriophagen T4 in transgenen Kartoffeln exprimiert (Düring et al., 1993, Plant J. 3, 587-598).

Da sich bakterielle Erkrankungen von Pflanzen jedoch oft unter anaeroben Bedingungen ausbreiten, werden die bisher übertragenen Resistenzfaktoren für Pflanzen nur sehr eingeschränkt wirksam. Das gilt besonders für die oben erwähnte Erkrankung der Kartoffel an Knollennaßfäule und Schwarzbeinigkeit, da die Infektion durch Erwinia carotovora überwiegend unter anaeroben Bedingungen erfolgt. Verstärkt wird dieser Effekt noch durch die Bildung eines Schleims aus Bakterien und Abbauprodukten der pflanzlichen Zellwand. Für

eine effektive Expression eines antibakteriellen Proteins unter optimalen Bedingungen ist deshalb die Steuerung des entsprechenden Fremdgens durch einen unter diesen Bedingungen aktiven Promotor anzustreben.

Bisher wurden 3 anaerobe Promotoren in transgenen Pflanzen getestet: Dabei handelt es sich um den Adhl Promotor aus Mais, den Adh Promotor aus Arabidopsis thaliana und den Gapc Promotor aus Arabidopsis thaliana. Der Adhl Promotor aus Mais wurde in Tabak und Reis untersucht (Ellis et al., 1987, EMBO J. 6, 11-16; Kyozuka et al., 1991, Mol. Gen. Genet. 228, 40-48), der Gapc Promotor aus Arabidopsis wurde in Tabak (Yang et al., 1993, Plant Physiol. 101, 209-210), und der Adh Promotor aus Arabidopsis wurde in Arabidopsis selber untersucht (Dolferus et al., 1994, Plant Physiol. 105, 1075-1087). Dabei stellte sich heraus, daß alle Promotoren nur eine 2 bis 81 fache Induktion des Reportergens über Hintergrund vermitteln und nicht in allen Geweben aktiv sind.

Ziel der Erfindung ist es, die Expression von Resistenzfaktoren in Nutzpflanzen zu erreichen und entsprechende
transgene Pflanzen zu erzeugen. Der Erfindung liegt die
Aufgabe zugrunde, die anaerobe Expression des T4 Lysozymgens
in der Kartoffel zu erreichen und entsprechende transgene
Pfanzen zu erzeugen. Eine spezifische Aufgabe besteht darin,
Kartoffeln gegenüber phytopathogenen Bakterien resistent zu
machen.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch ein Expressionssystem gelöst, das den Promotor GapC4 oder Teile oder Varianten des Promotors GapC4 und ein zu exprimierendes Gen umfaßt.

Gemäß der Erfindung handelt es um Gene für ein antibakterielles Protein, insbesondere für T4-Lysozym, um Resistenzgene gegen Viren, Nematoden, Bakterien und Pilze, Gene mit insektizider Wirkung, glykolyse-steigernde Gene und gärungssteigernde Gene.

Das Expressionssystem wird erfindungsgemäß für die anaerobe Genexpression in höheren Pflanzen angewendet. Bevorzugt kommt es in Kulturpflanzen wie Kartoffeln, Reis, Getreide, Mais, Tomaten, Brassicaceen, Leguminosen, Baumwolle, Zuckerrübe und Möhren zur Anwendung.

Die Erfindung betrifft auch höhere Pflanzen, vorzugsweise transgene Kulturpflanzen wie Kartoffeln, Reis, Getreide, Mais, Tomaten, Brassicaceen, Leguminosen, Baumwolle, Zuckerrübe und Möhren, die das erfindungsgemäße Expressionssystem enthalten.

Von besonderer Bedeutung sind transgene Kartoffeln, die ein Expressionssystem aus Promotor GapC4 und dem Gen für T4-Lysozym enthalten.

Der große Vorteil des erfindungsgemäß eingesetzten Promotors GapC4 (GenBank Accession Nr. L40803) besteht darin, daß er hervorragend geeignetes Zielstellung für die Induktionsprofil hat. Die anaerobe Expression erreicht die Stärke des unter aeroben Bedingungen für die Expression von Fremdgenen häufig verwendeten 35S Promotors des Blumenkohl Mosaikvirus (35S CaMV). Weiterhin ist der Promotor in allen Geweben, wie Blüte, Blatt und Wurzel, aktiv. Bisher wurde die Isolierung des GapC4 Gens sowie die anaerobe Induktion des GapC4 Promotors in einem transienten Expressionssystem in Mais Suspensionskulturzellen veröffentlicht (Kersanach et al., 1994, Nature 367:387-389).

Überraschenderweise ist der Promotor besonders in der Kulturpflanze Kartoffel aktiv.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Erfindung:

Ein weiteres Problem sind besonders in feuchtem Klima zeitweise Überflutungen von Feldern, die zu Ernteausfällen führen können. Als aerobe Organismen können Pflanzen längere Perioden großer Feuchtigkeit, die zur Abnahme des für die Pflanze verfügbaren Sauerstoffs führt, nicht überleben (Perata und Alpi, 1993, Plant Sci. 93, 1-17). Die Toleranz von Pflanzen gegenüber unzureichender Sauerstoffversorgung ist für einzelne Arten recht unterschiedlich. So keimt der Embryo in der Reis-Karyopse auch unter solchen Bedingungen ohne Schwierigkeiten, wohingegen Maiskeimlinge nur ca. 24 überleben. Eine generelle Sauerstoff ohne Stunden Anpassungsstrategie höherer Pflanzen an anaerobe Bedingungen ist die Steigerung der Glykolyse sowie das Anschalten von Pflanzen Toleranz von Gärvorgängen. Um die unzureichender Sauerstoffversorgung zu erhöhen, können die Gene, die bei der Glykolyse sowie bei der Gärung beteiligt eines anaerob induzierbaren Kontrolle die unter Diese Gene werden dann bei Promotors gebracht werden. unzureichender Sauerstoffversorgung exprimiert.

Die Erfindung wird nachfolgend an Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Ausführungsbeispiel

Um zu untersuchen, ob der GapC4 Promotor bei mit Erwinia Infektion sowie nach anaerob, Kartoffel GapC4 Promotorwird. werden induziert carotovora Reportergenkonstrukte in die Kartoffel transformiert. Nach Infektion der transgenen Kartoffel mit Erwinia carotovora, sowie nach Inkubation von Geweben der transgenen Kartoffel unter anaeroben Bedingungen kann die Reportergenexpression gemessen werden. Das Reportergen kann dann in vitro durch das Kartoffel die ersetzt werden und in Lysozymgen Die transgenen Kartoffeln werden transformiert werden. anschließend auf erhöhte Resistenz gegen Erwinia carotovora untersucht.

Die Reportergenkonstrukte wurden wie im folgenden beschrieben konstruiert:

Alle Agrobakterium T-DNA Konstrukte basieren auf dem binären Vektor pOCA28 (Honma et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 90, 6242-6246; Olszewski et al., 1988, Nucleic Acids Res 16, 10765-10782). Für T-DNA Konstrukte wurden Plasmide pUK443 und pUK444, die 785 bzw. 461 Basenpaare des GapC4 Promotors, das erste Intron des GapC4 Gens sowie das B-Glucuronidase Reportergen tragen, eingesetzt. Um mögliche negative Effekte des GapC4 Introns aus Mais in transgenen Tabakpflanzen und Intron durch wurde das auszuschließen, Kartoffeln Restriktionsverdau mit den Enzymen XhoI und NcoI aus den Plasmiden pUK443 und pUK444 herausgeschnitten. Nach einer Auffüllrekation der durch Restriktionsverdau entstandenen Enden wurden die intronlosen Plasmide pUK403 und pUK404 erzeugt. Die Promotor-Reportergenfragmente dieser Plasmide wurden durch einen PvuII Verdau herausgeschnitten und in die kloniert. pOCA28 Die von Schnittstelle resultierenden pOCA28 Derivate, pUK4030, 4040 und 4041 tragen das GapC4 Promotor-Reportergenkonstrukt. Als Kontrolle wurde Reportergen in ß-Glucuronidase promotorlose das kloniert. pUK4030 und 4040 tragen die Reportergenkonstrukte mit dem Promotor proximal zur rechten T-DNA Bordersequenz. In pUK4041 liegt das Reportergen in der anderen Orientierung vor.

Alle rekombinanten DNA Techniken werden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989, Molecular cloning. A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

T4-Lysozymgens, das Bkann Klonierung des Für die Glucuronidase Reportergen aus den Plasmiden pUK403 oder 404 durch Restriktionsverdau entfernt und an seine Stelle das T4durch den GapC4 Lysozymgen hineinkloniert werden. Das Lysozymgen wird . in **T4** kontrollierte Promotor Agrobakterium T-DNA Vektor umkloniert. Alle Konstrukte werden Agrobacterium tumefaciens in Einführung nach Standardprotokollen in die Kartoffel transformiert (Düring et al., 1993, Plant J. 3, 587-598; Fladung, 1990, Plant Breeding 104, 295-304). Transgene Kartoffeln werden mit Hilfe eines Antibiotikaresistenzgens auf der T-DNA selektiert und werden auf Expression des eingeführten B-Glucuronidase Reportergens

und des T4 Lysozymgens unter anaeroben Bedingungen sowie nach Infektion mit Erwinia carotovora untersucht.

Zur anaeroben Induktion wird pflanzliches Gewebe in einem luftdichten Glasbehälter (Merck) zusammen mit Anaerocult A Stunden inkubiert. Für für mindestens 12 Pflanzenmaterial assay wird das GUS fluorimetrischen B-Glucuronidase Substrat homogenisiert und mit dem Methylumbelliferyl-ß-D-Glucuronid (MUG) bei 37 °C inkubiert. Quantifizierungen der Fluoreszenz wird nach Jefferson et al., EMBO J. 6, 3901-3907 (1987) durchgeführt und Proteinkonzentrationen werden nach Bradford, Anal. Biochem. 7, 248-254 Gewebespezifität die Um bestimmt. (1976) Reportergenexpression zu messen wird das intakte anaerob induzierte Pflanzenmaterial mit einer Lösung 1 mM X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Glucuronsäure) vakuuminfiltriert Zur inkubiert. °C Nacht bei 37 über Sichtbarmachung der Anfärbung wird das Chlorophyll mit 70 % Ethanol extrahiert (Jefferson s.o.).

Um die Expression des T4 Lysozymgens zu messen, werden nach anaerober Inkubation des Gewebes Northern blot Analysen mit einer T4-Lysozym spezifischen Sonde durchgeführt. Gesamt RNA wird mit dem RNeasy Kit isoliert (Qiagen). Die Konzentration der RNA wird photometrisch bestimmt und 10 Microgramm der RNA wird in eine Spur auf ein 1 % Agarosegel gegeben, welches Formaldehyd enthält. Nach Elektrophorese wird die RNA aus dem Gel mit 0,05 N NaOH als Transferpuffer auf Nitrozellulose oder Nylonmembranen (Amersham) geblottet (Sambrook et al. Hybridisierung der Lysozym Markierung und s.o.). erfolat Filter Sonde mit dem RNA spezifischen Standardbedingungen (Sambrook et al. s.o., Düring et al., s.o.).

Nach Bestätigung der anaeroben Induktion des Reportergens sowie des T4-Lysozymgens wird untersucht, ob beide Gene auch nach Infektion mit dem phytopathogenen Bakterium Erwinia carotovora induziert werden, bzw. ob das T4 Lysozym-Gen unter der Kontrolle des GapC4-Promotors so aktiviert wird, daß es Resistenz vermittelt. Die Induktion des Reportergens und des T4 Lysozym-Gens wird wie oben beschrieben bestimmt. Dafür

7

wird das unter dem mazerierten Gewebe liegende Knollenmaterial genutzt.

Der Infektionstest wird mit einem pathogenen Stamm von Erwinia carotovora ssp. atroseptica oder ssp. carotovora in Luftabschluß durchgeführt. Plastikbehältern unter Größe definierter Scheiben Kartoffelknollen werden. hergestellt und in frisch geschnittenem Zustand mit einer definierten Anzahl von Bakterienzellen in einem kleinen Volumen in der Mitte inokuliert. Die Inkubation erfolgt in Plastikbehältern mit einer Wasserschicht auf dem Boden auf einem durchnäßten Filterpapier. Dadurch wird gesättigte Luftfeuchtigkeit erreicht. Das Bakterienwachstum wird anhand der Gewebemazeration und des entstehenden Bakterienschleims den sich bildenen Bakterienschleim nachverfolgt. Durch erfolgt eine luftabschließende Abdeckung der Kartoffelzellen. In Abhängigkeit von der Inokulumsdichte wird nach einer definierten Zeit das Ausmaß der Mazeration bestimmt. Durch Vergleich mit Kontrollexplantaten kann der relative Rückgang der Suszeptibilität festgestellt werden.

Alternativ können mit Bakterien infizierte Augenstecklinge unter feuchten Bedingungen im Gewächshaus ausgepflanzt und kultiviert werden. Durch Verschlämmung der Erde kommt es zu Sauerstoffarmut, die die Vermehrung der Bakterien begünstigt. Die Anzahl aufgelaufener, gesunder Sprosse wird im Vergleich zu Kontrollexplantaten bestimmt. Dadurch ist das Ausmaß der reduzierten Suszeptibilität bestimmbar.

8

Patentansprüche

- 1. Expressionssystem für die anaerobe Genexpression in höheren Pflanzen umfassend den Promotor GapC4 und ein zu exprimierendes Gen.
- 2. Expressionssystem nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Teile oder Varianten des Promotors GapC4.
- 3. Expressionssystem nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch ein Gen für ein antibakterielles Protein.
- 4. Expressionssystem nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch ein Gen für T4-Lysozym.
- 5. Expressionssystem nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch Resistenzgene gegen Viren, Nematoden, Bakterien und Pilze.
- 6. Expressionssystem nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch Gene mit insektizider Wirkung.
- 7. Expressionssystem nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch glykolysesteigernde Gene.
- 8. Expressionssystem nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet durch gärungssteigernde Gene.
- 9. Expressionssystem nach Anspruch 1 bis 8 zur Anwendung in allen höheren Pflanzen.
- 10. Expressionssystem nach Anspruch 1 bis 8 zur Anwendung in Kulturpflanzen.
- 11. Expressionssystem nach Anspruch 10 zur Anwendung in Kartoffeln, Reis, Getreide, Mais, Tomaten, Brassicaceen, Leguminosen, Baumwolle, Zuckerrübe und Möhren.

- 12. Transgene höhere Pflanzen, enthaltend ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 11.
- 13. Transgene Kulturpflanzen nach Anspruch 12.
- 14. Transgene Kartoffeln enthaltend ein Expressionssystem aus Promotor GapC4 und dem Gen für T4-Lysozym.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/DE 96/02428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/82 C12N15/53 A01H5/00 A01N63/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC **B. FIELDS SEARCHED** Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N AO1N AO1H IPC 6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Relevant to claum No. Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages 1,2 EMBL SEQUENCE DATABASE. REL. 43, Х 30-MAR-1995, ACCESSION NO. L40803, XP002031332 KERSANACH, R., ET AL.: "Zea mays glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GapC4) gene, promoter region" cited in the application 1,2,12, see sequence and comment Y & NATURE, vol. 367, 1994, pages 387-389, KERSANACH, R., ET AL.: Patent family members are listed in annex. Further documents are listed in the continuation of box C. Х "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the Special categories of cited documents: A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to "E" earlier document but published on or after the international filing date involve an inventive step when the document is taken alone "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu-O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or ments, such combination being obvious to a person skilled other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed '&' document member of the same patent family Date of mailing of the international search report Date of the actual completion of the international search 3 0, 05, 97 22 May 1997 Authorized officer Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Maddox, A Fax (+31-70) 340-3016

Form PCT/ISA/218 (second sheet) (July 1992)

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ategory *	DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
		1,2,12,
ı	ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, PORTLAND, OREGON, USA, JULY 30-AUGUST 3, 1994. PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE) 105 (1 SUPPL.).	13
	1994. 70. , XP002031350 MANJUNATH S FT AI: "Differential	
	regulation of maize glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase gene family under anoxia."	
	see abstract 347	1-4,9-14
, χ	PLANT JOURNAL 10 (1). 1996. 175-183., XP002031333 KOEHLER U ET AL: "A promoter for strong and ubiquitous anaerobic gene expression	
	in tobacco." see the whole document	
Ρ,Χ	PLANT MOLECULAR BIOLOGY 29 (6). 1995. 1293-1298.	1,2,9-11
	December 1995, XP002031334 KOEHLER U ET AL: "The maize GapC4 promoter confers anaerobic reporter gene	·
	expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus C1." see the whole document	
Α	MOL. GEN. GENET., vol. 229, 1991, pages 219-228, XP002031351 RUSSELL, D.A., ET AL.: "The maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: organ-specific expression and genetic analysis" see the whole document	1,2
A	PLANT PHYSIOLOGY, vol. 101, 1993,	1,2,9,12
	pages 209-216, XP002031335 YANG, Y., ET AL.: "Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in Arabidopsis" cited in the application	
	see the whole document PLANT PHYSIOLOGY,	1,2,9,12
A	vol. 99, 1992, pages 615-620, XP002031336 RUSSELL, D.A., ET AL.: "Protein synthesis in maize during anaerobic and heat stress"	
	see the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/DE 96/02428

vol. 105, 1994, , pages 1075-1087, XP002031338 DOLFERUS, R., ET AL.: "Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene" cited in the application see the whole document		INTERNATIONAL SEARCH NEW COST	PCT/DE 96	702428
A THE PLANT JOURNAL, vol. 3, no. 4, 1993, pages 587-598, XP002031337 DURING, K., ET AL.: "Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium Erwinia carotovora" cited in the application see the whole document A PLANT PHYSIOLOGY, vol. 105, 1994, pages 1075-1087, XP002031338 DOLFERUS, R., ET AL.: "Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Add gene" cited in the application see the whole document A EP 0 278 658 A (LUBRIZOL ENTERPRISES INC ;COMMW SCIENT IND RES ORG (AU)) 17 August 1988 see the whole document	C.(Continu	ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
THE PLANT JOURNAL, vol. 3, no. 4, 1993, pages 587-598, XP002031337 DÜRING, K., ET AL.: "Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium Erwinia carotovora" cited in the application see the whole document A PLANT PHYSIOLOGY, vol. 105, 1994, pages 1075-1087, XP002031338 DOLFERUS, R., ET AL.: "Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene" cited in the application see the whole document EP 0 278 658 A (LUBRIZOL ENTERPRISES INC ;COMMW SCIENT IND RES ORG (AU)) 17 August 1988 see the whole document		Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
See the whole document PLANT PHYSIOLOGY, vol. 105, 1994, pages 1075-1087, XP002031338 DDUFFRUS, R., ET AL.: "Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene" cited in the application see the whole document EP 0 278 658 A (LUBRIZOL ENTERPRISES INC ;COMMW SCIENT IND RES ORG (AU)) 17 August 1988 see the whole document 1,2,9	A	vol. 3, no. 4, 1993, pages 587-598, XP002031337 DÜRING, K., ET AL.: "Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium Erwinia carotovora" cited in the application		3,4
; COMMW SCIENT IND RES ORG (AU)) 17 August 1988 see the whole document	A	PLANT PHYSIOLOGY, vol. 105, 1994, pages 1075-1087, XP002031338 DOLFERUS, R., ET AL.: "Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene" cited in the application		1,2,9,12
	A	EP 0 278 658 A (LUBRIZOL ENTERPRISES INC; COMMW SCIENT IND RES ORG (AU)) 17 August		1,2,9,12
	!			

INTERNATIONAL SEARCH REPURI

Information on patent family members

mational Application No PCT/DE 96/02428

Patent document cited in scarch report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0278658 A	17-08-88	US 5001060 A AT 132903 T CA 1338858 A DE 3854870 D DE 3854870 T ES 2084582 T JP 63313588 A US 5290924 A ZA 8800320 A	19-03-91 15-01-96 21-01-97 22-02-96 04-07-96 16-05-96 21-12-88 01-03-94 11-07-88

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/DE 96/02428

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12N15/82 C12N15/53 A01 A01H5/00 A01N63/00 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen KJassifikation und der IPK **B. RECHERCHIERTE GEBIETE** Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N A01N A01H IPK 6 Recherchierte aber nicht zum Mindestprusstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete sallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegnise) C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Betr. Anspruch Nr. Kategorie* 1,2 EMBL SEQUENCE DATABASE. REL. 43, X 30-MAR-1995, ACCESSION NO. L40803, XP002031332 KERSANACH, R., ET AL.: "Zea mays glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GapC4) gene, promoter region" in der Anmeldung erwähnt 1,2,12, siehe Sequenz und Anmerkungen Y & NATURE, Bd. 367, 1994, Seiten 387-389, KERSANACH, R., ET AL.: Siehe Anhang Patentiamilie Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist 'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "X" Veröffendichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffendichung nicht als neu oder auf Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er-scheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden Veröffentlichung von besonderer Bedeuning, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit berühend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, veromenumenung, die sich auf eine mundiene Umenbarung.

veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebra
eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
eine Benutzung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach
dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist Absendedatum des internationalen Recherchenberichts Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 3 0.05.97 22.Mai 1997 Bevollmächtigter Bediensteter Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Maddox, A Fax: (+31-70) 340-3016

2

remationales Aktenzeichen
PCT/DE 96/02428

C.(Fortsetzu	mg) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	Day Against Ma
Categorie*	Bezeichnung der Veröffendichung, soweit erforderlich unter Angahe der in Betracht kom	menden Teile Betr. Anspruch Nr.
Y	ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, PORTLAND, OREGON, USA, JULY 30-AUGUST 3, 1994. PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE) 105 (1 SUPPL.). 1994. 70., XP002031350 MANJUNATH S ET AL: "Differential regulation of maize glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase gene family under anoxia." siehe Zusammenfassung 347	1,2,12,
Ρ,Χ	PLANT JOURNAL 10 (1). 1996. 175-183., XP002031333 KOEHLER U ET AL: "A promoter for strong and ubiquitous anaerobic gene expression in tobacco." siehe das ganze Dokument	1-4,9-14
P,X	PLANT MOLECULAR BIOLOGY 29 (6). 1995. 1293-1298., Dezember 1995, XP002031334 KOEHLER U ET AL: "The maize GapC4 promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus C1." siehe das ganze Dokument	1,2,9-11
A	MOL. GEN. GENET., Bd. 229, 1991, Seiten 219-228, XP002031351 RUSSELL, D.A., ET AL.: "The maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: organ-specific expression and genetic analysis" siehe das ganze Dokument	1,2
A	PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 101, 1993, Seiten 209-216, XP002031335 YANG, Y., ET AL.: "Stress responses and metabolic regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in Arabidopsis" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	1,2,9,12
A	PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 99, 1992, Seiten 615-620, XP002031336 RUSSELL, D.A., ET AL.: "Protein synthesis in maize during anaerobic and heat stress" siehe das ganze Dokument -/	1,2,9,12

PCT/DE 96/02428

	mg) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
(Fortsetzi	Bezeichnung der Veröffendichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kom	menden Teile	Betr. Anspruch Nr.
	THE PLANT JOURNAL, Bd. 3, Nr. 4, 1993, Seiten 587-598, XP002031337 DÜRING, K., ET AL.: "Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium Erwinia carotovora" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument		3,4
\	PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 105, 1994, , Seiten 1075-1087, XP002031338 DOLFERUS, R., ET AL.: "Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument		1,2,9,12
A	EP 0 278 658 A (LUBRIZOL ENTERPRISES INC; COMMW SCIENT IND RES ORG (AU)) 17.August 1988 siehe das ganze Dokument	·	1,2,9,12
	·		

INTERNATIONALEK KEUMEKUMENDERICITI

Angaben zu Veröffe.....chungen, die zur selben Patentfamilie gehören

pcT/DE 96/02428

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der	Mitglied(er) der	Datum der
	Veröffentlichung	Palentfamilie	Veröffentlichung
EP 0278658 A	17-08-88	US 5001060 A AT 132903 T CA 1338858 A DE 3854870 D DE 3854870 T ES 2084582 T JP 63313588 A US 5290924 A ZA 8800320 A	19-03-91 15-01-96 21-01-97 22-02-96 04-07-96 16-05-96 21-12-88 01-03-94 11-07-88